

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(51) Int. Cl.⁶
C12N 1/20

(11) Publication number : 10-1999-0080695
(43) Date of publication of application : 15.11.1999

(21) Application number : 10-1998-0014114
(22) Date of filing : 21.04.1998

(71) Applicant : KIM, Young Baek
LEE, Young Ha

(72) Inventor : LEE, Young Ha
KIM, Young Baek
KIM, Youn Seok
Jeong, Jeong Wook

(74) Agent : Kim, Won Ho
Song, Man Ho

(54) BIODEGRADABLE POLY(3-HYDROXYALKANOATE) HAVING RUBBER-ELASTICITY, PRODUCING STRAIN AND POLYMER STRUCTURE

(57) Abstract :

A polyhydroxyalkanoate block copolymer, which comprises C3~C5 or C6~C14 monomers produced by culturing a pseudomonas sp. HJ-2 strain deposited with KCTC 0406 in a culture medium containing saturated and/or unsaturated carboxylic acids, has great biocompatibility, biodegradability and elasticity. In addition, it is possible to control elasticity so that it can be applicable to a variety of uses such as agriculture, daily necessities, medical supplies, grocery packing and the field of medical science.

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 1/20	(11) 공개번호 특 1999-0080695 (43) 공개일자 1999년 11월 15일
(21) 출원번호 10-1998-0014114	
(22) 출원일자 1998년 04월 21일	
(71) 출원인 김영백 대전광역시 서구 내동 롯데아파트 118동 202호 이영하 대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 101동 701호	
(72) 발명자 이영하 대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 101동 701호 김영백 대전광역시 서구 내동 롯데아파트 118동 202호 김윤석 대전광역시 서구 가수원동 810-9 정정욱 대전광역시 서구 월평동 누리아파트 115동 1405호	
(74) 대리인 김원호, 송만호	

심사청구 : 있음

(54) 고무 탄성을 가지는 생분해성 폴리-3-히드록시알카노에이트, 생산균주 및 고분자 조성

요약

KCTC 0406 BP로 기탁되어 있는 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주를 포화 및/또는 불포화 카르복실산을 포함하는 배지에서 배양하여 생산한 C₃~C₅의 모노머 및/또는 C₆~C₁₄의 모노머를 포함하는 폴리히드록시알카노에이트 공중합체는 생체적합성, 생분해성 및 신축성이 우수하며 기질 탄소원의 종류, 농도 및 배양조건에 따라 탄성도를 조절할 수 있어 농업, 일상용품, 의료용품, 식품포장 및 의학 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 *Pseudomonas* sp. HJ-2에 의한 헵타노에이트의 일괄공급발효시 경과시간에 대한 세포 성장과 잔여 기질수의 그래프.

도 2는 *Pseudomonas* sp. HJ-2에 의하여 헵타노에이트로부터 합성한 폴리(3HB-co-3HV-co-3HHp)를 가메탄올화 반응하여 얻은 시료의 가스 크로마토그램.

도 3은 *Pseudomonas* sp. HJ-2에 의한 헵타노에이트의 일괄공급발효시 경과시간에 대한 PHA 조성의 변화를 나타낸 그래프.

도 4는 *Pseudomonas* sp. HJ-2에 의하여 헵타노에이트로부터 합성한 폴리(3HB-co-3HV-co-3HHp)의 용융점을 측정한 열분석도.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[산업상 이용분야]

본 발명은 생체적합성 및 생분해성이 우수한 폴리히드록시알카노에이트에 관한 것으로서, 더욱 상세하게

는 생체적합성 및 생분해성이 우수할 뿐만 아니라 다양한 모노머를 다양한 조성으로 함유하도록 함으로써 탄성을 자유롭게 조절할 수 있는 위생기구, 의료기구, 의료용품 등의 분해성과 탄성이 요구되는 모든 분야에서 유용한 폴리히드록시알카노에이트 및 그 생산공정에 관한 것이다.

[종래 기술]

우수한 내구성으로 인하여 종래부터 일상생활에 널리 사용되고 있는 합성 플라스틱 및 합성섬유 제품들은 사용 후 폐기되어 수십년이 지난 뒤에도 자연계에서 분해되지 않은 채 토양과 하천을 오염시키고 식물의 성장을 저해하는 등 심각한 환경오염 문제를 일으키고 있다. 이와 같은 플라스틱에 의한 환경오염의 원인은 미생물의 분해작용을 포함한 주변의 물리화학적 변화에 잘 견디는 플라스틱의 뛰어난 내구성 때문이다.

이와 같은 플라스틱에 의한 환경오염 문제를 해결하기 위하여 미생물에 의하여 분해되는 생분괴성 플라스틱이 개발되었다. 이들 생분괴성 플라스틱은 폴리올레핀 또는 폴리에스테르 등과 같은 기존의 합성플라스틱에 전분이나 금속 착물을 첨가하여 제조함으로써, 미생물의 분해작용 및 광산화 등의 작용에 의하여 쉽게 분괴될 수 있도록 제조되었다. 그러나, 이와 같은 생분괴성 플라스틱은 플라스틱 성분 중 전분질의 분해는 쉽게 일어나지만 합성플라스틱 부분은 여전히 분해되지 않고 남아 있어 환경을 오염시킬 뿐만 아니라, 이들 플라스틱 제조시에 사용된 금속 착물 부분이 또 다른 환경 오염원이 될 수 있는 문제점이 있다.

최근에는 이와 같은 합성플라스틱에 의한 환경오염 문제를 보다 근본적으로 해결하기 위하여, 생물 자체로부터 생성되는 바이오플라스틱(bioplastics)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이오폴리머(biopolymer)라고도 불리는 이들 바이오플라스틱은 미생물, 동물 또는 식물로부터 직접 얻어지는 천연 고분자 물질로서, 이들 중 일부는 기존의 합성플라스틱과 같이 우수한 기계적 내구성을 갖고 있어 일반 소재, 포장재, 농업용 필름 등의 재료로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 매우 우수한 생분해성을 가지고 있어서 자연계에서 일정한 시간이 경과하면 물과 이산화탄소로 완전히 분해되며, 인체에 무해함과 동시에 우수한 생체 적합성을 갖고 있어 생체에 사용되는 접착제, 밴드, 봉합사 등의 재료로도 사용된다.

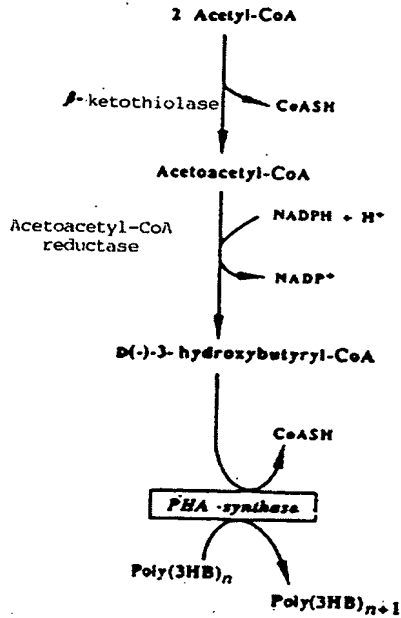
지금까지 공지된 바이오플라스틱으로는 풀루탄(pullutan), 키토산(chitosan), 크산탄(xanthan), 겔란(gellan), 람산(rhamsan), 폴리-베타-히드록시부틸레이트(poly-β-hydroxybutyrate, 이하 PHB라 함) 등이 있으며, 이들 중 폴리-베타-히드록시알카노에이트(poly-β-hydroxyalkanoates: 이하 PHAs라 함)의 일종으로 폴리에스테르와 폴리프로필렌의 중간적 성질을 갖는 PHB가 산업상 응용 가능성이 가장 큰 것으로 알려져 있다. 이 PHB는 자연계에서 미생물에 의하여 완전히 분해되며, 생체 내에 사용할 때 생체 내에서 자연히 흡수 분해되는 등의 특성을 갖고 있어, 환경오염 문제를 완전히 해결할 수 있는 생물열가소성 플라스틱(biothermoplastics)이다.

일반적으로 PHA는 일부 박테리아가 탄소원 및 에너지원으로 저장하는 저장 물질(storage material)로서 1926년에 M. Lemoigne에 의해 *Bacillus megaterium*에서 처음으로 PHAs 중의 하나인 PHB가 발견된(Poivier *et al.*, *Biotechnol.* 13:142-150, 1995) 이래 많은 연구가 진행되고 있다. PHAs는 세포 내에 포체(inclusion body) 형태로 존재하며, 질소(N), 인(P) 및 황(S) 등이 한정된 불균형의 조건(unbalanced condition)하에서 그 축적률이 증가하는 것으로 알려져 있다. PHAs는 PHAs를 구성하는 모노머인 3-히드록시알카노에이트(3-hydroxyalkanoates)의 탄소수에 따라 크게 단쇄길이(Short-Chain-Length, SCL; C₃~C₅) PHAs와 중쇄길이(Medium-Chain-Length, MCL; C₆~C₁₄) PHAs의 두 그룹으로 나뉘어지고, 이외에도 탄소수 15개에서 18개 사이의 모노머를 갖는 장쇄길이(Long-Chain-Length, LCL) PHAs가 보고되었다(Song *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 3:123-128, 1993). 이러한 길이의 차이는 PHAs의 전구물질인 3-히드록시알킬-CoA에 대한 PHA 신타제(synthase)의 친화력 차이 때문인 것으로 생각되고 있다.

현재까지 발견된 PHAs를 생합성하는 박테리아는 90속 이상이고, 약 90종류의 PHAs 모노머가 발견되었다(Song *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 3:123-128, 1993). 그 중에서 단쇄길이 PHAs를 생합성하는 대표적인 박테리아에는 *Alcaligenes* sp. 및 *Bacillus* spp. 등이 있는데, 특히 *Alcaligenes* sp.는 단쇄길이 PHA의 하나인 PHB 호모폴리머(homopolymer)를 생합성하는 대표적인 박테리아로 알려져 있다.

PHB의 용융점은 약 180℃ 정도로 40~60℃인 중쇄길이 PHA에 비하여 높은 편이다(Babu *et al.*, International symposium on bacterial polyhydroxyalkanoates. 48-54, 1996). 단쇄길이 PHA가 합성되는 대표적인 경로(pathway)는 *Alcaligenes* spp.에 의한 것으로, 두 개의 아세틸-CoA(acetyl-CoA)에서 아세토아세틸-CoA(acetoacetyl-CoA)를 만드는 것으로부터 시작되어 효소의 작용에 의해 PHB를 생합성한다(Poivier *et al.*, *Biotechnol.* 13:142-150, 1995). *Alcaligenes eutrophus*에 의한 PHB의 생합성 경로를 하기의 반응식 1에 나타내었다.

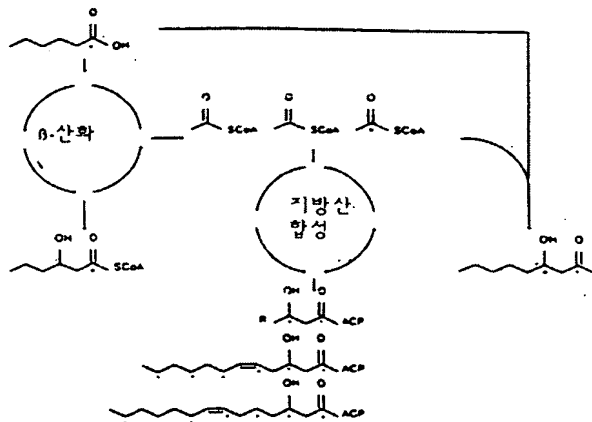
[반응식 1]



PHB를 생합성하는 *A. eutrophus*에서는 전체량의 최대 80%까지 PHB를 축적하며 *Chromobacterium violaceum*은 발러레이트(valerate)로부터 PHV 호모폴리머를 생합성하는 것으로 알려져 있다(Anderson *et al.*, *Microbiol. Rev.* 54:450-472, 1990; Steinbuchel *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 128:219-228, 1995). 또한 일부 박테리아에서는 주기질 이외에 프로피오네이트(propionate), 발러레이트, γ -히드록시 부틸로락톤(γ -hydroxy butyrolactone)과 같은 보조기질을 함께 넣고 배양할 때, 폴리(3HB-co-3HV), 폴리(3HB-co-4HB) 같은 코폴리에스테르(copolyester)도 합성하는 것으로 알려져 있다.

중쇄길이 PHA의 생합성에 관한 연구는 현재 주로 *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*와 같은 *Pseudomonas* spp.에서 광범위하게 이루어지고 있으며, 주로 β -산화(β -oxidation)와 디노보 지방산 생합성(denovo fatty acid biosynthesis)의 과정을 통하여 주어진 기질보다 더 길거나 짧은 모노머로 구성된 중쇄길이 PHA를 생합성한다. 헥사노에이트로부터 PHA 합성을 위한 전구체를 얻는 반응을 하기의 반응식 2에 나타내었다. 3-히드록시헥사노에이트 모노머는 β -산화과정을 거쳐 합성되고, 동시에 생성된 아세틸-CoA 분자는 디노보 지방산 생합성을 거쳐 PHA로 투입된다.

[반응식 2]



중쇄길이 PHAs는 단쇄길이 PHAs와는 달리 낮은 결정성과 40~60℃ 정도의 낮은 녹는점을 가지며, 모노머 측쇄(side chain)의 길이가 길어질수록 강한 고무탄성체의 성질을 갖는다(Babu *et al.*, *International symposium on bacterial polyhydroxyalkanoates*, 48-54, 1996).

대부분의 박테리아는 단쇄길이 PHAs 또는 중쇄길이 PHAs 중의 하나를 생합성하고 있으나 일부 *Pseudomonas* spp.에서는 단쇄길이 모노머와 중쇄길이 모노머가 모두 들어있는 PHAs를 생합성하는 것으로 알려져 있다(Kato *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:363-370, 1996; Lee *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:901-909, 1995; Steinbuchel *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:691-697, 1992). 단쇄길이 모노머와 중쇄길이 모노머를 모두 함유하는 PHA는 지금까지 알려지지 않은 다양한 물성을 가질 수 있기 때문에 많은 관심을 받고 있다. 또한 폴리(3HB)를 생합성하는 *A. eutrophus*의 폴리(3HB)-합성 유전자(synthetic gene)를 중쇄길이 PHAs를 생합성하는 *P. oleovorans*에

트랜스포메이션(transformation)한 재조합 균주(recombinant strain)에서도 단쇄길이 모노머와 중쇄길이 모노머가 같이 있는 PHAs를 생합성하지만 이들은 물리적인 혼합물이다(Timm *et al.*, *Appl. Microbiol Biotechnol.* 33:296-301, 1990).

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 생분해성 및 생체적합성이 우수한 PHA 내의 모노머를 다양하게 할뿐만 아니라 그 구성비를 조절함으로써 원하는 신축성 및 탄성을 갖는 PHA 및 그 생산균주를 제공하기 위한 것이다.

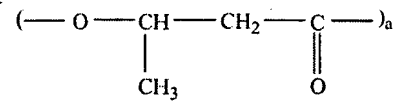
발명의 구성 및 작용

[과제를 해결하기 위한 수단]

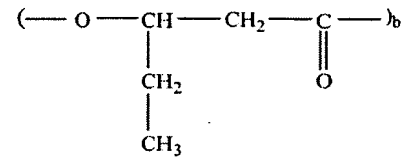
상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ 및 C₁₄ 모노머로 이루어진 균에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 모노머를 주단위체로 포함하는 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 생산하는 한국과학기술연구원 유전공학센터 유전자은행에 KCTC 0406 BP로 기탁되어 있는 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주를 제공한다.

상기한 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 2의 3-히드록시발러레이트 및 화학식 3의 3-히드록시헵타노에이트인 것이 바람직하다.

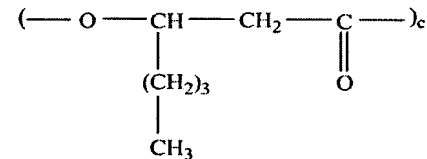
[화학식 1]



[화학식 2]



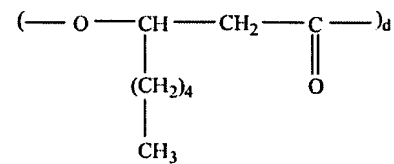
[화학식 3]



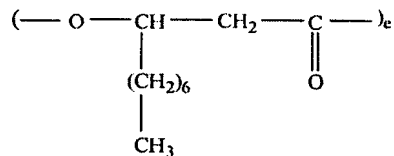
상기 화학식 1의 a는 5~100%, 화학식 2의 b는 0~95%이고, 화학식 3의 c는 0~80%이다.

또한 상기한 모노머는 하기의 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트, 화학식 5의 3-히드록시데카노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 것이 바람직하다.

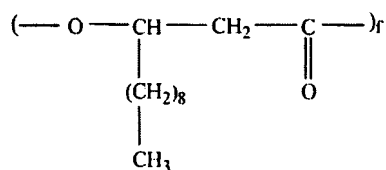
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



상기의 화학식 4의 d는 0~100%, 화학식 5의 e는 0~100%이고, 화학식 6의 f는 0~100%이다.

상기한 군주는 식물성 기름, 동물성 기름 및 어패류 기름으로 이루어진 군에서 선택되는 기름을 가수분해하여 얻어진 포화 및/또는 불포화 카르복실산을 포함하는 배지를 탄소원으로 하여 폴리히드록시알카노에이트를 합성하는 것이 바람직하다.

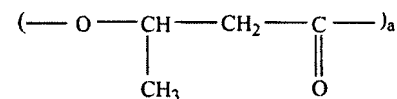
상기 식물성 또는 동물성 기름은 식용유, 폐식용유, 돼지기름 및 소기름으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

상기한 식용유 등의 기름은 증류수와 혼합하여 끓이면서 필요에 따라 물을 첨가하여 잘 혼합되도록 유지하면서 비누와 같이 엉킬 때까지 수산화나트륨(NaOH)를 가하여 얻어진 고체를 여과하거나 그 자체로 건조시키는 전처리 후에 사용한다.

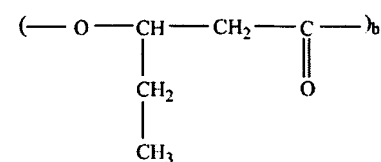
또한 본 발명에 있어서, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ 및 C₁₄ 모노머로 이루어진 군에서 선택되는 둘 또는 그 이상의 모노머를 주단위체로 포함하는 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 제공한다.

상기한 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 2의 3-히드록시발러레이트 및 화학식 3의 3-히드록시헵타노에이트인 폴리히드록시알카노에이트 공중합체인 것이 바람직하다.

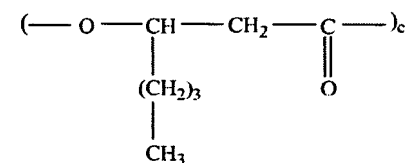
[화학식 1]



[화학식 2]



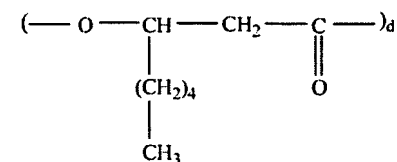
[화학식 3]



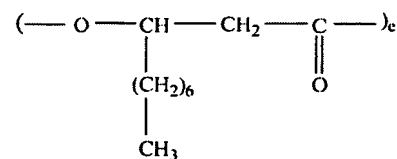
상기 화학식 1의 a는 0~90%, 화학식 2의 b는 0~90%이고, 화학식 3의 c는 10~95%이다.

또한 상기한 모노머는 하기의 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트, 화학식 5의 3-히드록시데카노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 것이 바람직하다.

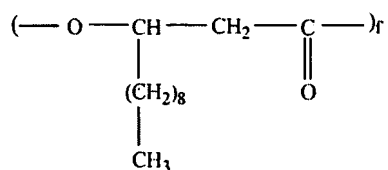
[화학식 4]



[화학식 5]



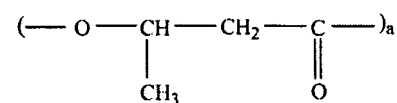
[화학식 6]



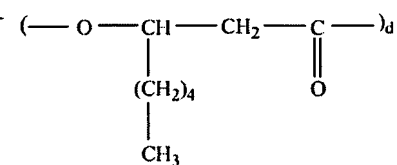
상기의 화학식 4의 d는 0~55%, 화학식 5의 e는 45~90%이고, 화학식 6의 f는 0~55%이다.

또한, 상기한 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트, 화학식 5의 3-히드록시데카노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 것이 바람직하다.

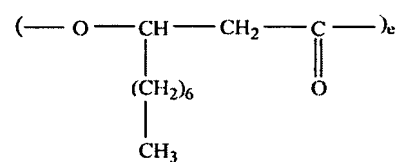
[화학식 1]



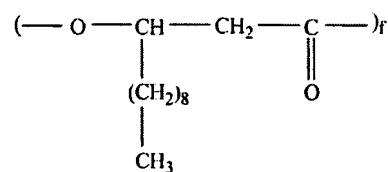
[화학식 4]



[화학식 5]



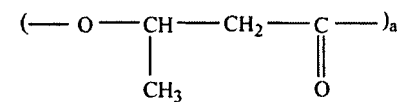
[화학식 6]



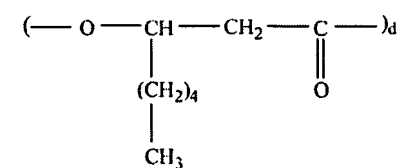
상기의 화학식 1의 a는 5~85%, 화학식 4의 d는 5~85%, 화학식 5의 e는 5~85%이고, 화학식 6의 f는 5~85%이다.

또한, 상기한 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 것이 바람직하다.

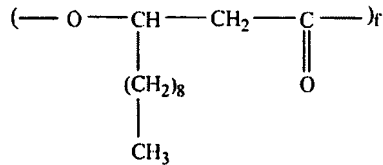
[화학식 1]



[화학식 4]



[화학식 6]



상기의 화학식 1의 a는 5~90%, 화학식 4의 d는 5~90% 및 화학식 6의 f는 5~90%이다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 상기한 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주를 포화 및/또는 불포화 카르복실산을 포함하는 배지에서 배양하여 폴리히드록시알카노에이트를 생성하는 공정을 포함하는 폴리히드록시알카노에이트의 제조방법을 제공한다.

상기한 포화 및/또는 불포화 카르복실산은 발레레이트, 헵타노에이트, 식물성 기름, 동물성 기름 및 어패류 기름으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

또한 본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 상기한 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 주성분으로 포함하는 탄성체를 제공한다.

상기한 탄성체는 의료용 고무 탄성체로서, 의료용 장갑, 고무줄, 포장재 또는 피임기구 등에 사용할 수 있다.

그리고 본 발명에 있어서, 상기한 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 이용하여 제조한 필름을 결정화 전 또는 후에 한쪽방향 또는 양방향으로 인장시키는 공정을 포함하는 향상된 인장도를 가진 폴리히드록시알카노에이트 공중합체의 제조방법을 제공한다.

또한 본 발명에 있어서, 상기한 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 포함하는 섬유, 직물 또는 필름 형태인 것을 특징으로 하는 성형물을 제공한다.

본 발명에서는 슬러지(sludge)에서 디알카노익에시드(dialkanoic acid)를 이용하여 자랄 수 있는 균주들을 분리하여 그 중 독특한 PHAs 생합성 양상을 보이는 *Pseudomonas* sp. HJ-2를 이용하여 본 균주가 모노알카노익에시드(monoalkanoic acid), 디알카노익에시드 등의 다양한 탄소원으로부터 PHAs를 생합성한다.

본 발명의 탄성체를 제조할 때, 고분자의 조성 및 처리 방법에 따라 그 성질이 달라진다. 이와 같이 탄성체의 탄성을 조절하는 방법에는 하기와 같이 여러 방법들이 사용될 수 있다.

첫 번째 방법은 고분자 조성 조절 방법과 동일한 방법으로서 *Pseudomonas* sp. HJ-2를 배양할 때, 탄소원의 농도, 산소의 농도 또는 질소의 농도를 조절하여 단쇄길이 PHA의 반복기와 중쇄길이 PHA의 반복기의 상대적인 양을 조절함으로써 탄성이 서로 다른 재료를 제조한다.

두 번째 방법은 얻어진 고분자를 처리하는 방법으로, 결정화를 시키기 전에 처리하는 방법과 결정화가 다 된 후에 처리하는 두 가지 방법이 있다. 하나는 고분자 필름을 원하는 모양으로 절단한 뒤, 4~5시간 결정화시키고 사각형으로 재단한 후, 인스트론(instron)을 이용하여 원래 길이의 200~400%로 굽어지지 않을 최대의 정도까지 인장하는 것이고, 또 하나는 원하는 필름을 원하는 모양으로 절단한 뒤, 결정화되지 않은 상태에서 인스트론을 사용하여 200~400%로 굽어지지 않을 최대의 정도까지 인장시켜 수분 내에 결정화가 일어나 서로 다른 탄성을 가진 재료를 제조하는 것이다.

세 번째 방법은 고분자와 수 %의 벤조페논(benzophenone) 또는 벤조페논 유도체와 같은 증감제(sensitizer)를 혼합하고 상기의 두 번째 또는 세 번째 방법과 같이 하여 준비한 재료를 얼음이나 드라이아이스를 사용한 낮은 온도에서 광조사시키면 가교된 서로 다른 탄성을 가진 재료를 제조한다.

또한 본 발명을 이용한 필름은 다음과 같이 제조할 수 있다. 첫째, 고분자를 클로로포름, 아세톤, 에틸아세테이트 등에 녹이고, 이를 수평을 조절한 유리, 금속 또는 테프론 등의 용기에 붓고 용매를 서서히 날려보내어 필름을 제조한다.

둘째, 고분자 덩어리를 두 장의 철판, 예를 들면 테프론 등으로 코팅된 철판사이에 놓여 있는 원하는 두께의 스페이스(spacer)에 놓고 상온~150℃로 가열한 후, 10~50톤의 압력으로 눌러 필름을 제조한다.

셋째, 상기의 첫 번째 또는 두 번째 방법으로 제조한 필름을 결정화되기 전에 한쪽방향(uniaxially) 혹은 양방향(biaxially)으로 인장하여 필름을 제조한다. 이 때 인장도는 100~파괴되기 직전이다.

넷째, 상기의 첫 번째 또는 두 번째 필름제조 방법으로 제조한 필름을 결정화시킨 후, 한쪽방향 혹은 양방향으로 인장시켜 필름을 제조한다. 이 때 인장도는 100~파괴되기 직전이다.

다섯째, 고분자와 수 %의 벤조페논이나 벤조페논 유도체와 같은 증감제를 혼합하여 상기한 방법으로 필름을 만들어 자외선을 조사한다.

또한 본 발명을 이용한 화이버(fiber)는 얻어진 필름을 한쪽방향으로 인장하고 인장된 방향으로 실의 형태로 얇게 찢어내어 제조한다.

[실시에]

이하 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기한 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 본 발명의 일 실시예일 뿐 본 발명이 하기한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

이하 본 발명을 실시예에 의거하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

실시예

균주 *Pseudomonas* sp. HJ-2의 분리 및 동정

Pseudomonas sp. HJ-2는 그람 양성, 옥시다제 및 카탈라제-양성이며, 포자 비형성 간상(rod-shaped) 형태를 갖는다. 한천배지에서 반투명성(translucent) 콜로니를 생성하며, 킹(King) B 배지 상에서 형광 색소는 생성하지 않으며, PCA(또는 NA)상에서 황색 비형광성 확산성 색소(diffusile pigment)를 생성하였다. 또한 하나 이상의 극성 편모(flagella)를 생성하며, 42℃에서 성장하였다.

또 다른 *Pseudomonas* sp. HJ-2의 특성을 정리하면 하기의 표 1과 같다.

[표 1]

조건	결과
수크로즈에서 점액 생산	-
β -갈락토시다제	-
아르기닌 디하이드롤라제	+
리신 디카복실라제	-
오르니틴 디카복실라제	-
시트레이트 이용능	+
H ₂ S 생산	-
우레아제 생산	-
트리토판 디아미나제	-
인돌 생산	-
VP 반응	-
젤라틴 액화	-
옥시다제	+
글루코즈, 만니톨, 이노시톨, 소르비톨, 람노즈, 수크로즈, 멜리비오즈, 아라비노즈, 아미그달린의 산	-
탈질소	+
β -글루코시다제	-
α -D-글루코즈, D-글루코네이트, 카프레이트, 아 디페이트, 말레이트, 페닐아세테이트의 이용능	+

또한 본 균주는 시트레이트, 석시네이트, 트윈40, 트윈 80, L-아라비노즈, D-만노즈, 아세테이트, 시스-아코니테이트(cis-aconitate), β -하이드록시부탈레이트, p-하이드록시 페닐아세테이트, 이타코네이트(itaconate), α -케토 글루타레이트, 퀴네이트(quinat), 프로피오네이트, D,L-락테이트, L-알라닌, L-아스파라긴, L-아스파라테이트, L-글루타메이트, 하이드록시 L-프롤린, L-프롤린, L-세린, 푸트레신(putrescine), D,L-카니틴(carnitine), γ -아미노부틸리에이트, 우로카네이트(urocanate), 이노신(inosine), 2-아미노에탄올에서 성장하였다.

Pseudomonas sp. HJ-2의 지방산 프로파일은 하기의 표 2와 같다.

[표 2]

C18:1 w7c/w9t/w12t	33.2%
C16:0	24.6%
C16:1 w7c/C15:0 이소 20H	21.5%
C12:0 20H	7.4%
C12:0 30H	3.9%
C10:0 30H	3.1%
C12:0	3.0%
C17:0 시클로	1.6%
C14:0	1.0%
C18:0	0.4%
C19:0 시클로 w8c	0.4%

상기와 같은 결과로 보아 *Pseudomonas* sp. HJ-2는 RNA 그룹 II에 속하는 *Pseudomonas caryophylli*로 동정되었다.

본 실시예에서 사용한 *Pseudomonas* sp. HJ-2는 슬러지에서 선택증균 배양(enrichment culture)을 통하여 얻었으며, 균주 보존을 위해 노나노에이트(nonanoate)를 탄소원으로 한 1/2E 배지 플레이트(media plate)에서 1주일 간격으로 계대배양하였다. *Pseudomonas* sp. HJ-2는 한국과학기술연구원 유전공학센터 유전

자은행에 1997년 11월 14일자로 수탁번호 KCTC 0406 BP로 기탁되었다. $\frac{1}{2}$ E⁺ 배지의 조성은 하기의 표 1에 나타내었다.

Pseudomonas sp. HJ-2는 30℃의 항온실에서 거대교반기(giant shaker)를 이용하여 2ℓ의 플라스크에서 1ℓ 배양하였으며 발효(fermentation)는 5ℓ의 용기(jar)에 3ℓ 발효 배지를 넣고 수행하였다. 플라스크와 발효 배양을 할 때 사용된 배지는 $\frac{1}{2}$ E⁺ 배지이고, 플라스크 배양과 발효를 하기 위한 시드 배지(seed medium)는 본 실시예에서 사용한 각각의 탄소원의 종류와 동일한 탄소원을 첨가하여 각 부피의 10%가 되게 하였다. 발효는 pH 7.0±0.1, 온도 30.0±1℃, 에어유속(air flow rate) 1.0vvm, 300rpm의 조건에서 수행하였다.

[표 3]

$\frac{1}{2}$ E⁺ 배지의 조성

배지 성분	플라스크 배지(g/ℓ)	발효 배지(g/ℓ)
NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	1.75	1.75
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	3.75	3.75
KH ₂ PO ₄	1.85	1.85
0.1M MgSO ₄ · 7H ₂ O	10	10
미네랄 용액	5	5
탄소원	5	5

상기에서 미네랄 용액의 조성은 하기의 표 4와 같다.

[표 4]

미네랄 용액의 조성

성분	농도(g/1M HCl 1ℓ)
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.78
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.98
CoSO ₄ · 7H ₂ O	2.81
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.67
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.17
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.29

생체량 측정 방법

분광기(spectrophotometer, Milton Roy spectronic 120011, U.S.A.)를 이용하여 원액을 1/5 희석하여 666nm에서 생체량을 측정하였다.

세포 하비스트(cell harvest) 및 동결건조

플라스크 배양과 발효 수행으로 얻어진 세포는 4℃에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리하여 수득하였으며 수득한 세포는 냉동실에서 얼린 뒤 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 건조 세포(dry cell)를 얻었다.

PHAs 추출 및 정제

동결건조한 건조 세포와 바다모래(sea sand)를 막자 사발에 함께 넣고 간 다음 텀블 필터(thimble filter)에 넣어 클로로포름을 이용하여 12시간동안 속슬레 추출기(soxhlet extractor)로 PHAs를 추출하였다. 추출한 PHAs는 메탄올을 사용하여 정제하였다. 위의 과정을 두세번 반복하여 정제된 PHAs를 얻었다.

PHAs의 조성분석

GC용 피렉스 캡 튜브(pyrex cap tube)에 정제된 PHAs 5mg과 클로로포름 1mℓ, 15% H₂SO₄가 들어있는 메탄올 1mℓ를 넣고 볼텍싱(vortexing)한 뒤 105℃ 건조 오븐에서 2시간동안 메탄올리시스(methanolysis)하였다. 건조 오븐에서 꺼낸 다음 완전하게 식힌 후에 증류수 1mℓ를 첨가하고 강하게 볼텍싱하여 클로로포름 층을 분석에 이용하였다. PHAs 기체 크로마토그래피의 조건을 표 5에 정리하였다.

[표 5]

항목	내용
모델 시스템(model system)	Hewlett Packard 5890 series II
디텍터(detector)	Flame Ionization Detector(FID)
칼럼(column)	Capillary HP-1, 25m ID 0.2mm (narrow bore)
액체상(liquid phase)	100% 디메틸 폴리실록산 (dimethyl polysiloxane, Gum)
고상 지지체(solid support)	Chromosorb PAW DMCS
투입 및 검출 포트 온도 (Inj. & Det. port temp.)	240/270°C
캐리어 기체(carrier gas)	N ₂
에어/수소 유속(air/hydrogen flow rate)	350/35ml/min
총속도(total flow)	102ml/min
셉텀 퍼지 벤트 속도 (septum purge vent flow)	1ml/min
칼럼 헤드 압력(column head pressure)	1ml/min
부가 기체 속도 (auxiliary(make-up) gas flow)	29ml/min
초기 온도 및 시간	80°C/4min
온도 상승 속도(temp. up-grade rate)	10°C/min
최종 온도 및 시간	230°C/3min
용매 투입량(solvent & inj. size)	CHCl ₃ (클로로포름)/1μl
투입 포트 모드(injection port mode)	분할 모드(split mode)
분할비(split ratio)	100 to 1

실시예 1: 설탕으로부터 PHA 합성

글루코즈와 글루코네이트(gluconate)를 각각 단일 탄소원으로 주고 2ℓ 플라스크에서 *Pseudomonas* sp. HJ-2를 1ℓ 배양을 한 결과 글루코즈에서 100% PHB 호모폴리머가 생합성되었으며, 글루코네이트에서는 PHB와 함께 중쇄길이 PHAs(3HO, 3HD, 3HDD)가 생합성되었다. *Pseudomonas* sp. HJ-2에 의하여 설탕으로부터 PHA 합성 결과는 하기의 표 6와 같다.

[표 6]

Pseudomonas sp. HJ-2에 의한 설탕으로부터 PHA의 합성

탄소원(g/ℓ)	DCW (g/ℓ)	PHAs (wt%)	PHA 조성								
			C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
글루코즈(10)	1.21	5.73	100								
프룩토즈(10)	0.98	17.85					29.23		60.87		9.9
글루코네이트(10)	0.79	11.45	76.73				5.29		15.31		2.47

실시예 2: 모노알카노익에시드로부터 PHA 합성

탄소수가 짝수개인 부틸레이트, 헥사노에이트, 옥타노에이트, 데카노에이트에서는 PHB가 주로 만들어졌는데, 옥타노에이트, 데카노에이트에서는 3HB와 함께 각각 8.5%와 22.3%의 3HO로 구성된 PHAs가 생합성되었다. 탄소수가 홀수개인 모노알카노익에시드를 단일 탄소원으로 주었을 때는 탄소수 5개인 발러레이트에서는 주로 3HV가 생합성되었고 탄소수 7개인 헵타노에이트에서는 폴리(3HB-co-3HV-co-3HHp) 형태의 PHAs가, 탄소수 9개인 노나노에이트에서는 3HHp와 3HN의 중쇄길이 PHAs가 생합성되었다(표 5). 이것으로 보아 *Pseudomonas* sp. HJ-2는 주어진 탄소원의 탄소수를 구분하여 짝수개의 탄소수에서는 주로 PHB의 폴리머를 생합성하고 홀수개의 탄소수에서는 주어진 탄소원의 탄소수에 해당하는 길이의 PHAs를 생합성함을 알 수 있다. 특히, 홀수개의 탄소수를 가진 탄소원을 주었을 때 주어진 탄소원의 탄소수 이상의 길이를 갖는 PHAs를 생합성하지는 않는 것으로 보아 모노알카노익에시드를 기질로 주었을 때에는 β-산화에 의해서 주어진 탄소원의 길이보다 짧거나 그 길이에 해당하는 길이를 갖는 PHAs를 생합성하는 것으로 생각되고 주어진 길이보다 더 긴 수의 PHAs를 생합성할 수 있는 PHAs를 생합성할 수 있는 디노보 지방산 생합성 과정은 거치지 않는 것으로 생각할 수 있다.

[표 7]

Pseudomonas sp. HJ-2에 의한 모노알카노익에시드로부터 PHA의 합성

탄소원 (mM/ℓ)	DCW (g/ℓ)	PHAs (wt%)	PHA 조성								
			C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
부틸레이트(56.75)	1.54	11.91	100								
발러레이트(48.96)	1.16	36.03	6.3	93.7							
헥사노에이트(43.04)	2.11	25.17	100								
헵타노에이트(38.40)	0.64	17.03	21.6	43.1		35.3					
옥타노에이트(34.67)	2.38	22.82	91.5	<1			8.5				
노나노에이트(31.60)	0.53	12.57	<1	<1		22		78			
데카노에이트(29.02)	1.12	42.95	80.64				11.2		8.16		

실시예 2: 디알카노익에시드로부터 PHA 합성

디알카노익에시드에서는 홀수개의 탄소를 가진 탄소원을 단일 탄소원으로 주었을 때 PHB 호모폴리머가 생합성되었다. 즉, 디헵타노에이트(diheptanoate)와 디노나노에이트(dinonanoate)를 단일 탄소원으로 주고 2ℓ의 플라스크에서 1ℓ 배양을 하였을 때 모두 PHB 호모폴리머가 생합성되었다. 한편, 짝수의 탄소를 가진 디옥타노에이트를 단일 탄소원으로 주었을 때는 3HO, 3HD 및 3HDD의 조성을 갖는 중쇄길이 PHAs를 합성하는 것을 알 수 있다(표 8).

[표 8]

Pseudomonas sp. HJ-2에 의한 모노알카노익에시드로부터 PHA의 합성

탄소원 (mM/ℓ)	DCW (g/ℓ)	PHAs (wt%)	PHA 조성								
			C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
디헵타노에이트 (31.22)	1.26	8.61	100								
디옥타노에이트 (28.70)	0.73	14.11					20.79		64.20		15.01
디노나노에이트 (26.56)	0.94	23.46	100								
디데카노에이트 (24.72)	0.84	5.55					26.23		61.97		11.8

디알카노익에시드에서 나온 결과는 모노알카노익에시드에서 보인 결과와는 반대의 현상을 보이고 있다. 모노알카노익에시드에서는 짝수개의 탄소원에서 PHB 호모폴리머가 생합성되는 반면 디알카노익에시드에서는 홀수개의 탄소원에서 PHB 호모폴리머가 생합성되고 짝수개의 탄소를 갖는 디알카노에이트에서는 주어진 기질보다 더 긴 탄소수의 모노머를 갖는 PHAs를 생합성하였다. 주어진 탄소원의 길이보다 더 긴 탄소수를 갖는 PHAs를 만든다는 것은 디노보 지방산 생합성 과정을 통하여 PHAs를 합성하는 것으로 생각할 수 있다(반응식 2). 모노알카노익에시드와 디알카노익에시드의 차이점은 디알카노익에시드의 측쇄에 -OH기가 하나 더 있는 것인데 그 차이점으로 인해 모노알카노익에시드에서는 β-산화과정을, 디알카노익에시드에서는 디노보 지방산 생합성 과정을 통하여 PHAs가 생합성된다고 생각되고 있다. 이것은 아마도 PHAs를 생합성하는데 관여하는 효소의 주어진 탄소원에 대한 기질 특이성 때문인 것으로 고려된다.

실시예 3: 헵타노에이트에서의 발효

헵타노에이트를 단일 탄소원으로 주고 30℃, 300rpm에서 일괄공급 발효(fed batch fermentation)를 수행하였다. 일괄공급 발효에서 탄소원을 2.8g/ℓ로 시작하여 모두 쓰인 탄소원의 양은 5.2g/ℓ가 되었으며 도 1에서 기질 소모량은 배양시간 30시간 정도에서 80% 이상이 소모되었음을 알 수 있다. 도 1에서 ○는 660nm에서의 광학밀도(Optical Density: OD)를 나타내고, ●는 잔여 기질을 나타낸다. PHA의 조성 분석을 한 GC 결과는 도 2에 도시하였다. 도 2를 보면 그 조성은 3HB, 3HV, 3HHp로 분석되었다. 시간 별로 100㎖씩 샘플링하여 PHAs를 추출하여 모노머 조성을 알아보았다(도 2). 샘플링한 시간과 상관없이 4개의 샘플에서 모두 거의 일정한 비율로 3HB:3HV:3HHp=50:30:20의 모노머 조성비를 갖는 것을 알 수 있다. 이것은 *Pseudomonas* sp. HJ-2가 헵타노에이트에서 PHA를 만들 때 어느 한 PHA 모노머를 선호하여 먼저 합성하고 어느 하나를 나중에 합성하는 것이 아니라 항상 일정한 비율로 각각을 동시에 생합성한다는 것을 알려준다. 또한 3HB:3HV:3HHp=50:30:20으로 각각의 모노머가 유의성있는 농도를 차지하고 있기 때문에 기존에 알려진 터폴리머(terpolymer)를 이루는 모노머의 비율이 낮은 터폴리머 PHAs와는 차이가 있는 것으로 생각된다. 헵타노에이트에서 얻은 PHA를 DSC로 물성을 조사한 결과 폴리(3HB-co-3HV-co-3HHp)의 녹는점은 110.76℃(도 4)로서 녹는점이 180℃인 PHB보다는 낮고 40~60℃인 일반적인 중쇄길이

PHAs보다는 높은 것을 알 수 있다.

Pseudomonas sp. HJ-2가 글루코즈, 부틸레이트, 헥사노에이트 등을 단일 탄소원으로 주었을 때 PHB 호모 폴리머를 생합성하는 것은 *A. eutrophus*를 비롯한 대부분의 단쇄길이 PHA 생합성 균주의 합성 기능과 유사함을 보여주며 글루코네이트에서 3HB와 중쇄길이 모노머(3HO, 3HD, 3HDD)가 생합성되는 것은 *P. aeruginosa*의 PHA 합성기능과 유사함을 보여주고 있다. 또한 옥타노에이트에서 3HO가 생합성되고 헵타노에이트에서 3Hp가 생합성되며 노나노에이트에서 3HN이 생합성되는 것은 *P. oleovorans*를 비롯한 일반 *Pseudomonas*의 PHA 합성기능과 유사하다. 마지막으로 헵타노에이트에서 폴리(3HB-co-3HV-co-3Hx)를 생합성하는 것은 *Rhodococcus ruber*가 헥사노에이트로부터 폴리(3HB-co-3HV-co-3Hx)를 생합성하는 기능과 비슷하다. 이처럼 *Pseudomonas* sp. HJ-2는 여러 균주에서 보이는 특징들을 골고루 가진다. 또한 모노알카노익에이드에서 보이는 결과와 디알카노익에이드에서 보이는 결과에서 알 수 있듯이 이 균주가 갖는 PHA-생합성 경로에 대한 조사가 있어야 한다. 즉 PHAs를 생합성할 때 β -산화 과정과 디노보 지방산 생합성 과정을 어떻게 이용하는지에 대해 알아보아야 한다. 여러 가지 탄소원을 조합하여 다양한 모노머로 구성된 PHAs를 생산하여 그 조성에 따른 PHA의 물성 및 그 응용가능성에 대한 연구하여 *Pseudomonas* sp. HJ-2로부터 특정 PHA를 생합성하기 위한 최적 조건에 대한 연구도 진행 중에 있다.

발명의 효과

Pseudomonas sp. HJ-2를 이용하여 제조한 쇠의 길이가 다양한 모노머의 조성을 가진 PHA는 생체적합성, 생분해성 및 신축성이 우수하고, 기질인 탄소원의 농도에 따라 탄성도를 조절함으로써 종래의 PHA에 비하여 보다 유용하게 여러 의료 기술 분야에서 사용될 수 있다. 특히, 생체적합성이 우수하여 인공 유방 또는 콘돔에서 사용되는 난분해성 고무와 대체하여 사용함으로써 난분해성의 문제를 해결할 수 있다.

(57) 청구의 범위

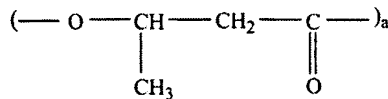
청구항 1

C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ 및 C₁₄ 모노머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 모노머를 주단위체로 포함하는 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 생산하는 한국과학기술연구원 유전공학센터 유전자은행에 KCTC 0406 BP로 기탁되어 있는 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주.

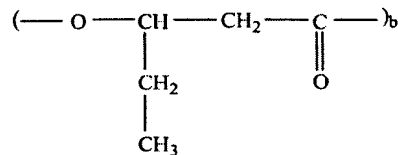
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 2의 3-히드록시발러레이트 및 화학식 3의 3-히드록시헵타노에이트인 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주.

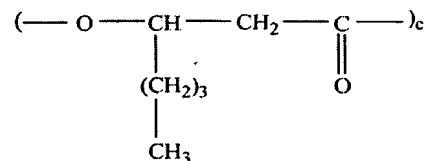
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]

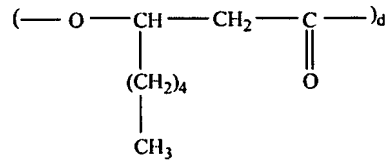


상기 화학식 1의 a는 5~100%, 화학식 2의 b는 0~95%이고, 화학식 3의 c는 0~80%이다.

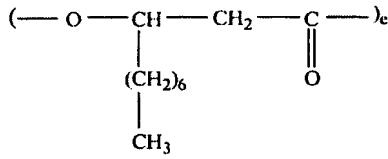
청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 모노머는 하기의 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트, 화학식 5의 3-히드록시데카노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주.

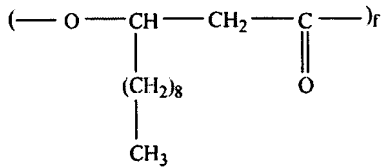
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



상기의 화학식 4의 d는 0~100%, 화학식 5의 e는 0~100%이고, 화학식 6의 f는 0~100%이다.

청구항 4

제1항 내지 제3항의 어느 한 항에 있어서, 상기 균주는 식물성 기름, 동물성 기름 및 어패류 기름으로 이루어진 군에서 선택되는 기름을 가수분해하여 얻어진 포화 및/또는 불포화 카르복실산을 포함하는 배지를 탄소원으로 하여 폴리히드록시알카노에이트를 합성하는 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주.

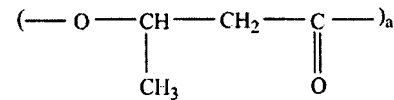
청구항 5

C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ 및 C₁₄ 모노머로 이루어진 군에서 선택되는 둘 또는 그 이상의 모노머를 주단위체로 포함하는 폴리히드록시알카노에이트 공중합체.

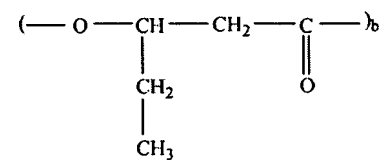
청구항 6

제5항에 있어서, 상기 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 2의 3-히드록시발러레이트 및 화학식 3의 3-히드록시헵타노에이트인 폴리히드록시알카노에이트 공중합체.

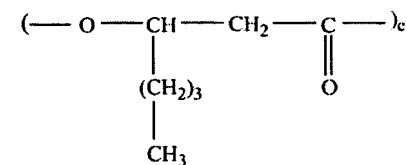
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



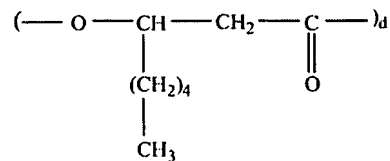
상기 화학식 1의 a는 0~90%, 화학식 2의 b는 0~90%이고, 화학식 3의 c는 10~95%이다.

청구항 7

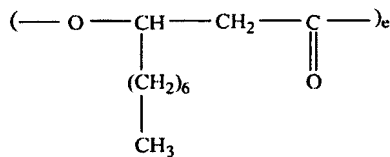
제5항에 있어서, 상기 모노머는 하기의 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트, 화학식 5의 3-히드록시데카

노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 폴리히드록시알카노에이트 공중합체.

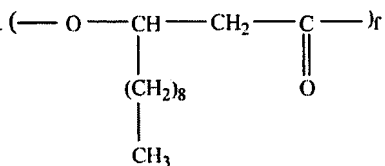
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]

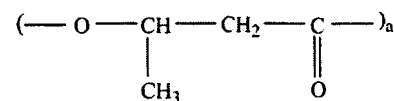


상기의 화학식 4의 d는 0~55%, 화학식 5의 e는 45~90%이고, 화학식 6의 f는 0~55%이다.

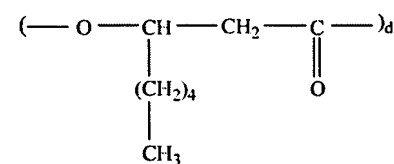
청구항 8

제5항에 있어서, 상기 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트, 화학식 5의 3-히드록시데카노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 폴리히드록시알카노에이트 공중합체.

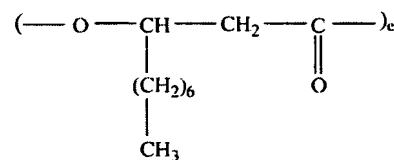
[화학식 1]



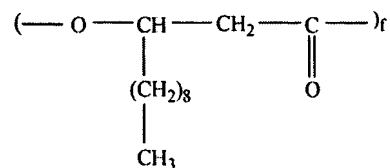
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]

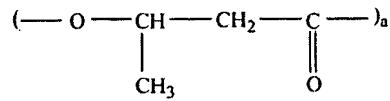


상기의 화학식 1의 a는 5~85%, 화학식 4의 d는 5~85%, 화학식 5의 e는 5~85%이고, 화학식 6의 f는 5~85%이다.

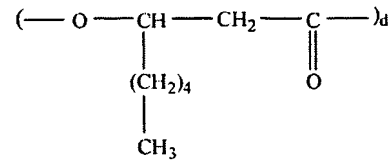
청구항 9

제5항에 있어서, 상기 모노머는 하기의 화학식 1의 3-히드록시부틸레이트, 화학식 4의 3-히드록시옥타노에이트 및 화학식 6의 3-히드록시도데카노에이트인 폴리히드록시알카노에이트 공중합체.

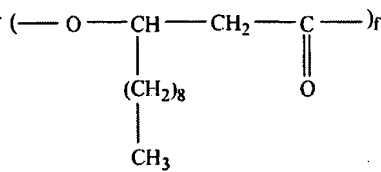
[화학식 1]



[화학식 5]



[화학식 6]



상기의 화학식 1의 a는 5~90%, 화학식 4의 d는 5~90% 및 화학식 6의 f는 5~90%이다.

청구항 10

제1항의 *Pseudomonas* sp. HJ-2 균주를 포화 및/또는 불포화 카르복실산을 포함하는 배지에서 배양하여 폴리히드록시알카노에이트를 생성하는;

공정을 포함하는 폴리히드록시알카노에이트의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 포화 및/또는 불포화 카르복실산은 발러레이트, 헵타노에이트, 식물성 기름, 동물성 기름 및 어패류 기름으로 이루어진 군에서 선택되는 폴리히드록시알카노에이트의 제조방법.

청구항 12

제5항의 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 주성분으로 포함하는 탄성체.

청구항 13

제5항의 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 이용하여 제조한 필름을 결정화 전 또는 후에 한쪽방향 또는 양방향으로 인장시키는 공정을;

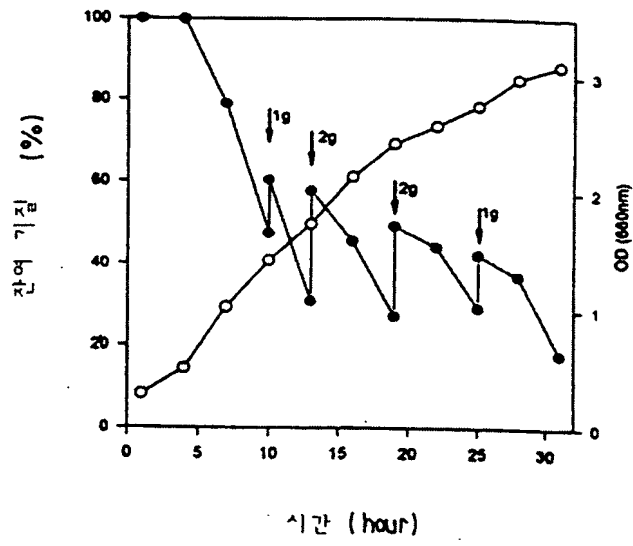
포함하는 향상된 인장도를 가진 폴리히드록시알카노에이트 공중합체의 제조방법.

청구항 14

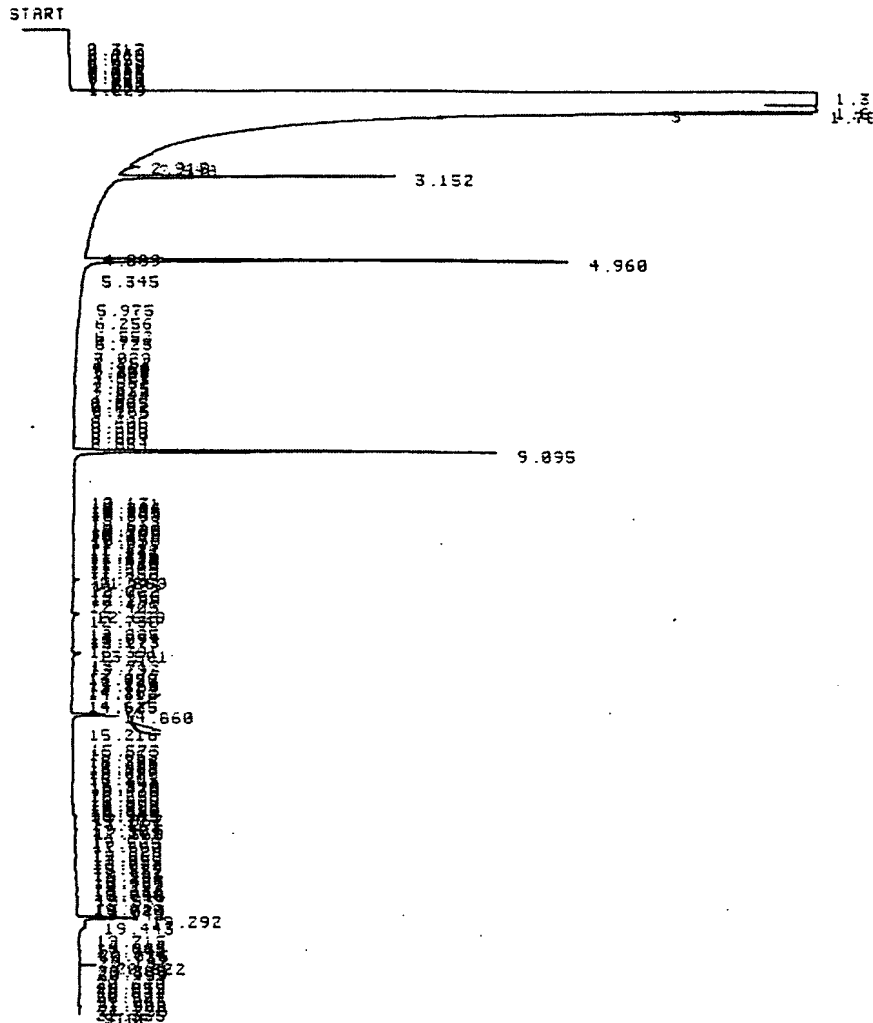
제5항의 폴리히드록시알카노에이트 공중합체를 포함하는 섬유, 직물 또는 필름 형태인 것을 특징으로 하는 성형물.

도면

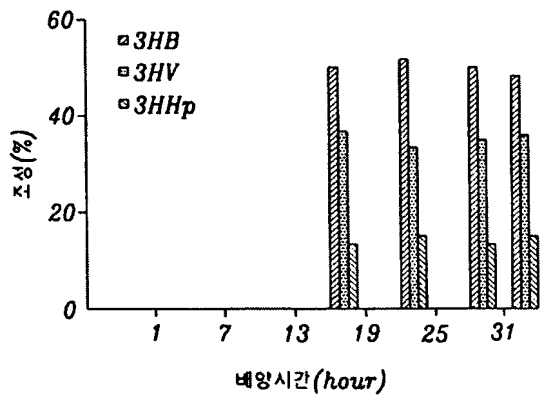
도면1



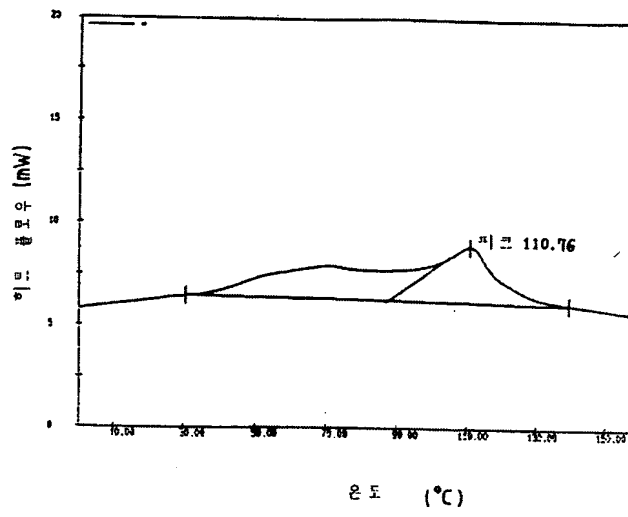
도면2



도면3



도면4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.